

PCT/KR 9 9 / 0 0 3 4 7

KR99/347

RO/KR 10.9.1999

REC'D 20 SEP 1999

WIPO PCT

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

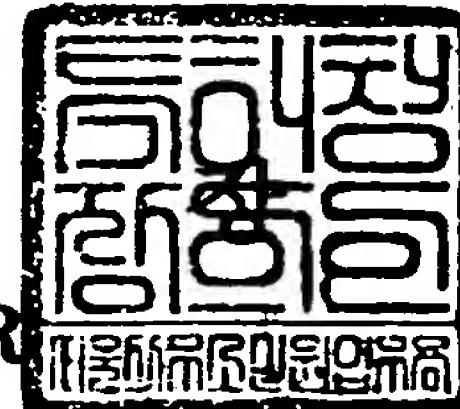
출원번호 : 1998년 특허출원 제25935호
Application Number

출원년월일 : 1998년 6월 30일
Date of Application

출원인 : 주식회사 대웅제약
Applicant(s)



1999년 6월 17일



특허청

COMMISSIONER

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

특허출원서

【출원번호】 98-025935

【출원일자】 1998/06/30

【발명의 국문명칭】 생체내(*in vivo*) 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 트롬보포이에틴 유도체

【발명의 영문명칭】 A novel human thrombopoietin mutein

【출원인】

【국문명칭】 주식회사 대웅제약

【영문명칭】 Dae Woong Pharmaceutical Co., Ltd.

【대표자】 윤재승

【출원인코드】 12004089

【출원인구분】 국내상법상법인

【우편번호】 135-090

【주소】 서울특별시 강남구 삼성동 163-3

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 이원희

【대리인코드】 H360

【전화번호】 02-3453-0507

【우편번호】 135-080

【주소】 서울특별시 강남구 역삼동 642-16(성지하이츠 II 805호)

【발명자】

【국문성명】 정주영

【영문성명】 CHUNG, JOO YOUNG

【주민등록번호】 651221-1403013

【우편번호】 463-060

【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 한신아파트 210동 1204호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 박상규

【영문성명】 PARK, SANG KYU

【주민등록번호】 700813-1010013

【우편번호】 131-141

【주소】 서울특별시 종로구 묵1동 177-3

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 주상명

【영문성명】 JU, SANG MYOUNG

【주민등록번호】 670228-1074410

【우편번호】 463-010

【주소】 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔주공아파트 408동 401호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 안혜경

【영문성명】 AHN, HYE KYUNG

【주민등록번호】 711007-2231718

【우편번호】 463-060

【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 이매촌청구아파트 609동 1305호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 임승욱

【영문성명】 LIM, SEUNG WOOK

【주민등록번호】 660311-1030117

【우편번호】 461-160

【주소】 경기도 성남시 수정구 신흥동 2024 두산아파트 106동 702호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 장우익

【영문성명】 CHANG, WOO IK

【주민등록번호】 700412-1626117

【우편번호】 463-500

【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 202 무지개마을 엘지아파트 213동 104호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이병광

【영문성명】 LEE, BYOUNG KWANG

【주민등록번호】 681025-1467113

【우편번호】 463-500

【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 110 하얀마을 502동 1003호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 박승국

【영문성명】 PARK, SEUNG KOOK

【주민등록번호】 630327-1253727

【우편번호】 462-120

【주소】 경기도 성남시 중원구 상대원동 산 19-4 산호아파트 409호

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 고여욱

【영문성명】 KOH, YEO WOOK

【주민등록번호】 630926-1057011

【우편번호】 463-050

【주소】 경기도 성남시 분당구 서현동 시범 한신아파트 126동 601호

【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

이원희 (인)

【심사청구】 특허법 제60조의 규정에 의하여 위와 같이 출원심사를 청구합니다.

대리인

이원희 (인)

【수신처】 특허청장 귀하

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	24 면	24,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	8 항	365,000 원
【합계】	418,000 원	

- 【첨부서류】
1. 요약서, 명세서(및 도면) 각 1통
 2. 출원서 부분, 요약서, 명세서(및 도면)을 포함하는 F0부분 1통
 3. 위임장(및 동 번역문)
 4. 미생물기탁증(및 동 번역문) 각 1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신규한 인간 트롬보포이에틴(human thrombopoietin, 이하 'hTPO'로 약칭 함) 유도체 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 유전자 재조합 방법으로 천연형 hTPO의 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환하여 당쇄를 도입함으로써 생체내(*in vivo*) 혈소판 증식효능을 획기적으로 향상시킨 신규의 hTPO 유도체를 제조함으로 항암치료나 골수이식에 따른 혈소판 감소증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 7

【명세서】

【발명의 명칭】

생체내(*in vivo*) 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 트롬보포이에틴 유도체

【도면의 간단한 설명】

도 1은 오버랩 중합효소연쇄반응을 이용하여 돌연변이 hTPO 유도체 cDNA를 제조하는 과정을 도시한 것이고,

1 : 서열 1의 시발체;

2 : 서열 2의 시발체;

N : N-시발체;

C : C-시발체;

S : 시그널 서열;

도 2는 돌연변이 hTPO 유도체 유전자를 이동벡터 pBlueBac4에 연결시키는 과정을 나타낸 것이고,

도 3는 천연형 hTPO를 공지의 pCDNA3.1 벡터에 삽입하여 제조한 pCDT 벡터에 돌연변이 hTPO 유도체 cDNA를 클로닝하여 동물 세포 발현벡터를 작제하는 과정을 도시한 것이고,

도 4은 M-07e 세포증식 검정법으로 동물 세포에서 발현된 hTPO 유도체의 활성을 측정하여 나타낸 것이고,

도 5은 천연형 hTPO을 처치한 마우스로부터 혈소판 수를 측정하는 방법으로 생체내(*in vivo*) 활성을 조사하여 나타낸 것이고,

도 6은 동물 세포에서 발현된 hTPO 유도체를 36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 처치한 마우스로부터 혈소판 수를 측정하는 방법으로 생체내 활성을 조사하여 나타낸 것이고,

도 7은 동물 세포에서 발현된 hTPO 유도체를 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 처치한 마우스로부터 혈소판 수를 측정하는 방법으로 생체내 활성을 조사하여 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 생체내(*in vivo*) 혈소판 증식효능이 향상된 신규한 인간 트롬보포이에틴(human thrombopoietin, 이하 'hTPO'로 약칭함) 유도체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

보다 상세하게는 본 발명은 유전자 재조합 방법으로 천연형 hTPO의 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환하여 당쇄를 도입한 신규의 hTPO 유도체, 이를 암호하는 염기 서열, 상기 염기 서열을 포함한 발현벡터 및 그의 제조방법, 발현세포주 그리고 이들을 이용한 hTPO 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

항암치료 또는 골수이식하는 경우와 기타 여러 원인에 의하여 유발되는 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 골수세포내에 존재하는 혈소판 전구세포인 거핵구 콜로니 형성 전구세포들이 항암치료 또는 골수이식하는 과정에서 파괴되고 이로 인하여 혈소판의 수가 부족하게 됨으로써 유발되는 질병으로서, 가벼운 외적 자극에 의하여 쉽게 출혈이 일어나며, 혈소판 감소증이 심한 경우 외부적인 자극 없이도 출혈이 일어나게 된다. 또한 출혈이 일어난 경우 치료가 잘 안되기 때문에 심할 경우에는 사망까지 이르는 심각한 문제가 되고 있다.

현재까지 이러한 혈소판 감소증을 치료하는 방법으로는 혈소판을 수혈하는 방법이

유일하게 사용되고 있다. 그러나 이는 혈소판 수혈에 필요한 혈액의 제공자가 부족하다는 문제점 이외에 에이즈 바이러스 또는 간염 바이러스등과 같은 혈액에서 유래한 감염원에 의한 감염 및 외래 혈소판의 수혈에 따른 면역반응의 유발 등과 같은 부작용이 있다.

혈소판은 거핵구 전구세포로부터 만들어지는 혈액성분으로서, 출혈을 억제하는 기능을 나타내고, 그 수는 간 또는 신장에서 생성되고 분비되는 당단백질인 트롬보포이에틴(thrombopoietin, 이하 'TPO'라 약칭함)에 의하여 조절되는데, TPO는 콜수세포내에 존재하는 혈소판의 전구세포인 거핵구 전구세포의 증식과 분화를 촉진시켜 혈소판의 생성을 유도하여 궁극적으로 혈소판 수를 증가시킨다(Lok 등, *Nature*, 369: 565-568 (1994); De savage 등, *Nature*, 369: 533-568 (1994)).

TPO 중 인간 트롬보포이에틴(hTPO)이 1994년에 최초로 cDNA 형태로 클로닝된 이후 (Lok 등, *Nature*, 369: 565-568 (1994); De savage 등, *Nature*, 369: 533-568 (1994); Miyazaki 등, *Experimental hematol.*, 22: 838 (1994); 국제특허공개 제95/18858호) hTPO가 혈소판 수를 조절하는 기능을 갖고 있음을 이용하여 항암치료 및 콜수이식시 유발되는 혈소판 감소증을 치료하고자 임상실험을 진행하고 있다 (Murray 등, *Exp. Hematol.*, 26: 207-216 (1998)).

이후 천연형 hTPO의 활성을 개선하고자 하는 연구들이 다양하게 진행되고 있는데 이는 크게 3가지 방법으로 접근하고 있다.

hTPO는 세포내에서 353개의 아미노산으로 구성된 전구체로서 발현된 후, 21개 아미노산의 시그널 서열이 잘리면서 332개의 아미노산으로 구성된 활성형 단백질로 세

포외로 분비되는 당단백질이다. hTPO는 적혈구 생성을 증가시키는 적혈구 생성인자인 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO)과 높은 서열 상동성을 갖고 있으며 hTPO의 활성을 나타내는 부위인 처음 151개 아미노산 서열과, hTPO의 세포외 분비, 체내 안정성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되는 상기 서열을 제외한 C-말단 부위의 두가지 영역으로 구분된다(Eaton 등, *Exp. Hematol.*, 25:1-7 (1997)), 이러한 천연형 hTPO를 변형시키는 첫번째 방법은, hTPO의 C-말단 부위를 결실시킨거나 또는 C-말단 부위를 결실시킨 후 새로운 아미노산을 결합시키는 것이다. 이러한 방법으로서 암젠(Amgen)사는 hTPO₁₅₁(아미노산 1-151), hTPO₁₇₄(아미노산 1-174) 유도체와 hTPO₁₆₃의 N-말단에 메치오닌-라이신을 첨가시킨 유도체를 제조하였다. 그러나 시험관내 실험에서는 활성이 유지되는 반면 생체내 실험결과 천연형 hTPO 보다 활성이 저하된 것으로 나타났다(국제특허공개 제95/26746호, 국제특허공개 제95/25498호).

또 제넨텍(Genetech)사의 경우 N-말단에 메치오닌을 첨가한 hTPO₁₅₃ 유도체를 대장균에서 발현시켜 제조하였고(국제특허공개 제95/18858호), 기린(Kirin)사의 경우 C-말단부위를 결실시킨 여러 유도체와 hTPO₁₆₃내의 특정 아미노산을 치환시키거나 결실 또는 삽입시킨 유도체들을 제조하였으며(국제특허공개 제95/21919호), 그 외에 지모제네틱스(Zymogenetics)사(국제특허공개 제95/21920호, 국제특허공개 제95/17062호) 및 지디셀(G. D. Searle)사(국제특허출원 제 96/23888호)와 같은 연구기관에서 TPO의 C-말단부위를 결실시킨 여러 유도체들을 제조하였으나, 모두 생체내 실험결과 천연형 hTPO에 비해 혈소판 생성활성이 우수한 유도체를 만드는데는 실패하였

다.

두번째 방법은 암젠사의 hTPO₁₆₃-PEG와 같이 hTPO 절편에 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, 이하 'PEG'로 약칭함)을 부가하여 유도체를 만드는 것이다(국제특허공개 제95/26746호).

그러나, 상기 방법은 hTPO의 안정성에 중요한 역할을 하는 C-말단부위가 없으므로 체내 안정성 저하 및 단백질 접힘(folding)의 변화로 인한 체내 면역학적 방어 시스템에의 노출용이성으로 인한 안전성 저하 그리고 단백질 발현에의 문제점 등이 나타날 수 있다. 또한 PEG가 hTPO 절편에 부가될 때 일정 비율로 부가되지 않으므로 품질의 불균질성 문제를 일으킬 수 있다.

또 다른 방법으로는 hTPO에 당쇄를 도입함으로써 hTPO의 활성을 증가시키고자 하는 것이다.

이러한 방법으로서 암젠사는 hTPO를 암호하는 cDNA에 있는 특정 염기를 치환시켜 아스파라진-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 형태로 돌연변이시킴으로써 C-말단이 결실된 174개 아미노산으로 구성된 hTPO에 N-연결형 당쇄를 하나 이상 도입하여 활성이 증가된 hTPO 유도체를 제조하고자 하였다(국제특허공개 제96/25498호).

한국생명공학연구소는 암젠사와는 달리 hTPO를 절단하지 않고 천연형 hTPO에 당쇄를 도입하여 당쇄가 하나 추가된 hTPO 유도체를 제조하였다(박홍록 등, *J. Biol. Chem.*, 273:256-261 (1998)).

그러나 생체내 실험결과 이들은 모두 천연형 hTPO 보다 활성이 유의적으로 높게 나

타나지는 않았다.

상기에서 설명한 바와 같이 생물학적 활성이 향상된 hTPO 유도체를 여러 가지 방법으로 개발하고자 하였으나 모두 천연형보다 생체내 활성이 향상된 hTPO 유도체를 얻는데는 실패하였다.

일반적으로 많은 단백질들은 당과 단백질이 결합된 당단백질로 존재하는데, 이러한 당쇄화는 단백질의 특정위치에서 발생하며 대개 두가지 종류로 분류되는데, 대개 당의 결사슬이 세린 또는 트레오닌 아미노산의 산소에 부착되는 O-연결형 당쇄화와 아스파라진-X-세린/트레오닌(X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 아스파라진의 질소에 부착되는 N-연결형 당쇄화가 있다.

당단백질의 당쇄는 단백질의 물리화학적, 생물학적 특성에 많은 영향을 미쳐 단백질의 안정성과 분비에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 특히 생체내 생물학적 활성 및 약물동력학적 성질에 중요한 영향을 준다(Jenkins 등, *Nature Biotechnological.*, 14:975 - 981 (1996); Liu 등, *Act. TIBTECH.*, 10:114 - 120 (1992)).

그 예로써 인간 인터페론 감마(human interferon- γ)나 글루코오스 전달 단백질(glucose transport protein)의 경우 N-당쇄 부위가 도입되는 아스파라진 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 당쇄가 도입되지 못하도록 하였을 때, 단백질의 생물학적 활성도가 현저히 감소하는 것으로 나타남으로써 N-당쇄가 당단백질의 활성에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다(Sareneva 등, *Biochemical J.* 303:831 - 840 (1994); Asano 등, *FEBS*, 324:258 - 261 (1993)).

그러나 또한 당쇄가 추가로 도입된다고 하여 단백질의 생물학적 활성이 따라서 증가되는 것은 아니다. 이는 상기 암젠사 및 한국생명공학연구소의 선행기술(국제특허공개 제96-25498호; 박홍록 등, *J. Biol. Chem.*, 273:256-261 (1998))들에서 확인된 바와 같이 당쇄가 추가되었지만 단백질의 생물학적 활성은 오히려 천연형보다 감소하였다. 따라서 당쇄가 추가로 도입됨으로써 단백질의 활성이 증가되기 위하여는 당쇄가 많이 붙은 것이 중요한 것이 아니라 특정위치에 도입되어야만 한다.

이에 본 발명자들은 hTPO의 생물학적 활성을 증가시키고자 여러 위치에 당쇄가 도입된 유도체들을 다양하게 제조하여 활성을 측정하여 본 결과 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환한 hTPO 유도체가 놀랍게도 기존의 다른 hTPO 유도체들과는 달리 천연형 hTPO에 비해 현저하게 향상된 생체내 혈소판 생성능력을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 생체내(*in vivo*)에서 혈소판 생성활성이 천연형 hTPO 보다 향상된 새로운 hTPO 유도체를 제공함에 그 목적이 있다.

구체적으로, 본 발명은 천연형 hTPO의 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환하여 당쇄를 도입함으로써 생체내(*in vivo*) 혈소판 생성활성이 향상된 hTPO 유도체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 hTPO 유도체를 암호하는 유전자를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 유전자를 적당한 벡터에 도입한 다음 이 벡터로 숙주 세포를 형질전환하고 이로부터 얻어진 형질전환체를 적당한 배지에서 배양하여 hTPO 유도

체를 얻는 hTPO 유도체 제조방법을 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 천연형 hTPO의 164번 아미노산인 아르기닌을 아스파라진으로 치환하여 당쇄를 도입한 생체내(*in vivo*) 혈소판 생성활성이 향상된 hTPO 유도체를 제공한다.

우선 본 발명은 생체내(*in vivo*)에서 혈소판 생성활성이 향상된 hTPO 유도체를 개발하기 위하여, hTPO 단백질의 특정부위가 N-당쇄가 도입될 수 있는 아스파라진-X-세린(X는 프롤린을 제외한 아미노산) 서열이 되도록 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 당쇄가 하나 또는 두 개 도입된 여러 종류의 hTPO 유도체를 제조하였다.

구체적으로 본 발명은 천연형 hTPO에 당쇄가 하나 추가된 hTPO 유도체를 제조하기 위하여 오버랩 중합효소 연쇄반응(overlap PCR; Cheng 등, *PNAS*, 91:5695 (1994))에 의한 부위특이 돌연변이법(site-specific mutagenesis)을 이용하여 천연형의 hTPO의 특정 아미노산이 치환된 hTPO 유도체의 유전자를 분리하였다(도 1 참조).

우선, 하기 변이 염기서열을 포함하는 시발체를 화학적으로 합성한다. 이 시발체는 양 방향의 올리고 뉴클레오파이드로 각각 새롭게 치환시키고자 하는 '아미노산의 염기서열을 포함하고 그 서열을 중심으로 5'-방향과 3'-방향으로 hTPO 유전자의 염기서열에 해당하는 몇 개의 염기가 연결된 한 쌍의 센스 및 안티센스 시발체이다.

【표 1】

부위 특이 돌연변이 유도를 위한 시발체

유도체	시발체 이름	서열
40429	29-N	5'-GCTGT GGTGT TGCCC TGTGG-3'
	29-C	5'-ACAGG GCAAC ACCAC AGCTC-3'
40430	30-N	5'-CTGCA GAGTT TAAAC GGAAC CCAG-3'
	30-C	5'-GGGTT CCGTT TAAAC TCTGC AG-3'
40431	31-N	5'-AGAGG GTGGA ATTCC CTACA AGCA-3'
	31-C	5'-TGCTT GTAGG GAATT CCACC CTCT-3'
40432	32-N	5'-GGGCC CGGTT GACGC AGA-3'
	32-C	5'-TCTGC GTCAA CCGGG CCC-3'
40433	33-N	5'-GGACT AGAGA CGTGT TGCTG GGGAC-3'
	33-C	5'-GTCCC CAGCA ACACG TCTCT AGTCC-3'
40434	34-N	5'-GCCAG AACTA ACGGA TCTGG GCTTC-3'
	34-C	5'-GAAGC CCAGA TCCGT TAGTT CTGGC-3'

오버랩 PCR(overlap PCR)은, 구체적으로 hTPO cDNA 유전자가 클로닝되어 있는 공지의 이동벡터 pBlue404(대한민국 특허출원 제 97-7512호)를 주형으로 하고 hTPO 시그널 서열의 염기 서열을 포함하는 서열 1의 올리고 뉴클레오타이드와 상기 표 1의 변이 염기서열을 포함하는 올리고 뉴클레오타이드 쌍 중 N-시발체, 그리고 나머지 C-시발체와 hTPO C-말단 전사해독틀 부분과 종결코돈을 포함하는 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드를 각각 시발체로 하여 수행하였다.

상기 오버랩 PCR의 산물은 각각 hTPO 유전자의 시그널 서열을 포함하고 N-말단에서 아미노산 치환 부위까지 그리고 아마노산 치환 부위에서 C-말단까지에 해당하는 염기 서열을 포함하게 된다.

아미노산 변이가 일어날 염기서열 부위를 포함하는 완전한 길이의 hTPO cDNA 유전자를 얻기 위하여, 상기 두 오버랩 PCR 산물을 주형으로 하고 상기 서열 1 및 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드를 시발체로 하여 PCR을 수행하였다.

이러한 과정으로 1078 bp의 변이 염기서열 부위를 포함하는 완전한 길이의 hTPO 유도체 cDNA를 제조하였다(도 1 참조).

상기 과정으로 제조한 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 형질전환체를 제조하기 위하여 먼저 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 이동벡터를 제조하고 이 벡터를 이용하여 발현 벡터를 제조하였다.

구체적으로 공지의 이동벡터 pBlueBac4와 각 hTPO 유도체 유전자를 제한효소 *Bgl* II 및 *Eco* RI으로 각각 절단하고 T4 DNA 라이게이즈(T4 DNA ligase)로 연결하여 각 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터를 얻었다(도 2 참조).

상기에서 얻어진 이동벡터의 종류와, 그 이동벡터내의 변화된 hTPO 유도체 유전자 서열과 그로 인해 치환되는 아미노산 부위를 하기 표 2에 나타내었다.

【표 2】

hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 이동벡터 및 치환된 아미노산 서열과 유전자 서열

이동벡터	아미노산 변이	염기 변이
pBlue29	¹¹⁷ R → ¹¹⁷ N	AGG → AAC
pBlue30	¹⁰⁸ L → ¹⁰⁸ N	CTT → AAT
pBlue31	¹⁴⁰ G ¹⁴¹ G → ¹⁴⁰ G ¹⁴¹ N	GGAGGG → GGGAAAT
pBlue32	¹⁵³ R → ¹⁵³ N	AGG → AAC
pBlue33	¹⁶⁴ R ¹⁶⁵ T → ¹⁶⁴ N ¹⁶⁵ T	AGAACCC → AACACCG
pBlue34	¹⁹³ T ¹⁹⁴ G → ¹⁹³ N ¹⁹⁴ G	ACTGGT → AACCGGA

상기 이동벡터를 동물세포에 형질전환시키기 위하여 포유동물세포 발현벡터를 제조하였다.

구체적으로 천연형 hTPO를 공지의 pCDNA3.1 벡터에 삽입하여 제조한 pCDT 벡터와 상기의 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터 pBlue29, pBlue30, pBlue31,

pBlue32, pBlue33, pBlue34를 제한효소 *Nhe* I 및 *Eco* RI으로 각각 절단하고 T4 DNA 라이제이즈로 연결하여 각 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터를 얻었다(도 3 및 표 3 참조).

【표 3】

hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 동물세포 발현벡터 및 치환된 아미노산 서열과 유전자 서열

발현벡터	아미노산 변이	염기 변이
p40429	¹¹⁷ R → ¹¹⁷ N	AGG → AAC
p40430	¹⁰⁸ L → ¹⁰⁸ N	CTT → AAT
p40431	¹⁴⁶ G ¹⁴⁷ G → ¹⁴⁶ G ¹⁴⁷ N	GGAGGG → GGGAAAT
p40432	¹⁵³ R → ¹⁵³ N	AGG → AAC
p40433	¹⁶⁴ R ¹⁶⁵ T → ¹⁶⁴ N ¹⁶⁵ T	AGAACCC → AACACCG
p40434	¹⁹³ T ¹⁹⁴ G → ¹⁹³ N ¹⁹⁴ G	ACTGGT → AACCGGA
p40435	p40404 + p40414	
p40436	p40404 + p40416	
p40437	p40411 + p40414	
p40438	p40411 + p40416	
p40439	p40414 + p40416	

이 때, 유전 암호 서열의 디제너리시(degeneracy)에 기인하여 표 3에 표시된 DNA 서열과는 다르지만 표 3의 아미노산 서열을 암호하는 조건에 부합하는 다른 염기 서열도 본 발명의 범주에 포함된다. 즉, 본 발명은 상기 표 3의 변화된 아미노산 서열을 포함하는 hTPO 유도체의 아미노산 서열을 암호하는 모든 염기 서열을 들연 변이 hTPO 유전자의 염기 서열로 제공한다.

구체적으로 서열 3과 서열 4의 염기서열을 가지는 시발체에 의해 들연변이가 도입

된 hTPO 유도체 발현벡터 p40433에 의해 발현되는 hTPO 유도체는 서열 5의 아미노산 서열을 포함하고, 이를 암호하는 염기 서열은 서열 6의 염기 서열뿐 아니라 유전 암호 서열의 디제너리시에 의한 동종의 염기 서열을 포함한다.

상기에서 제조한 이동벡터에 돌연변이가 바르게 도입되었는지 확인하기 위하여, PCR 산물의 염기 서열을 결정할 수도 있지만, 돌연변이 유도 시발체의 제작시에 시발체의 염기 서열에 새로운 제한효소 부위를 도입하거나 또는 주형에 있던 제한효소 부위가 소멸되도록 하여 돌연변이 유전자를 만들고 나서 특정제한효소로 반응시켜보면 DNA 염기서열 분석을 하지 않고도 간편하게 돌연변이가 도입되었는지 여부를 판단할 수 있다. 예를 들어 발현벡터 p40433의 경우 돌연변이가 도입되면, 천연형 hTPO의 염기서열 GAACCT가 ACACGT로 바뀌게 되어 제한효소 *AfI*III의 새로운 절단부위를 생성하게 된다. 따라서 발현벡터 p40433을 제한효소 *AfI*III로 반응시켜보면 돌연변이의 도입 유무를 쉽게 확인할 수 있다.

또한 본 발명은 hTPO 내의 두 부위에 당쇄를 도입하기 위하여 상기 hTPO 유도체 cDNA를 포함하는 발현벡터를 이용하여 hTPO 단백질의 서로 다른 두 부위의 아미노산이 치환된 유도체를 제조하였다.

구체적으로 각 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터 두 종을 제한효소로 각각 절단하고 상기 pCDT 벡터에 클로닝하여 서로 다른 두 부위의 아미노산이 치환된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 발현벡터를 얻는다. 그 예로서 발현벡터 p40429를 제한효소 *Nhe* I 및 *BspM* I으로 절단하여 $^{117}\text{Arg} \rightarrow ^{117}\text{Asn}$ 의 아미노산 치환부위가 포함된 DNA 절편을 분리하고, 발현벡터 p40431를 제한효소 *BspM* I 및 *Bsu*36 I

로 절단하여 $^{147}\text{Gly} \rightarrow ^{147}\text{Asn}$ 의 아미노산 치환부위가 포함된 DNA 절편을 분리한 다음 pCDT 벡터를 *BspM* I 및 *Bsu36* I으로 절단하고 이들을 연결시킴으로써 $^{117}\text{Arg} \rightarrow ^{117}\text{Asn}$ 와 $^{147}\text{Gly} \rightarrow ^{147}\text{Asn}$ 의 두 아미노산 치환 부위가 도입된 유전자를 포함한 발현 벡터 p40435를 얻었다(표 3 참조).

상기에서 제조한 발현 벡터를 이용하여 hTPO 유도체를 발현하는 동물세포 형질전환체를 제조하였다.

구체적으로 상기 발현 벡터를 리포펙타민 방법을 이용하여 동물세포 CHO/K-1에 형질전환시켜 각각의 hTPO 유도체를 발현하는 동물세포 형질전환체를 제조하였다. 본 발명에서는 동물세포로 CHO/K-1 세포를 이용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니고 다른 동물세포들도 이용할 수 있으며 CHO/dhfr(-), BHK 세포 등을 이용하는 것 이 바람직하다.

상기 형질전환 세포주를 벡터 이름에 맞추어 CHO K-1/p40429, CHO K-1/p40430, CHO K-1/p40431, CHO K-1/p40432 등으로 명명하고 이 중 CHO K-1/p40433을 국제기탁기관인 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 1998년 6월 17일 자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 0495BP).

상기 동물세포 형질전환체를 배양하여 이로부터 동물세포에서 발현된 hTPO 유도체를 제조하였다.

구체적으로 형질전환체를 혈청이 함유된 배지에서 대량으로 계대배양한 다음 분비 배지로 교체배양하여 배양 상등액을 얻고, 이를 농축, 투석하여 hTPO 유도체를 얻었다.

상기 CHO K-1/p40433을 배양하여 분리한 hTP0 유도체는 서열 5의 아미노산 서열을 포함한다.

상기 동물세포에서 발현된 hTP0 유도체들을 벡터 이름에 따라 40429 내지 40439로 명명하고 이들의 시험관내(*in vitro*) 생물학적 활성을 조사하기 위하여 거핵구세포 성 백혈병 세포주의 세포증식 검정법을 수행하였다.

그 결과 40429, 40430, 40432, 40433, 40434, 40437, 40438, 40439 유도체들이 천연형 hTP0 보다 우수한 생물학적 활성을 보였으며, 당쇄가 하나 도입된 경우와 두 개가 도입된 경우 각각 활성이 증가한 것들과 저하된 것들이 모두 나오는 것으로 보아 도입된 수와 활성과의 비례적 관계는 없는 것으로 나타났다(도 4 참조).

상기 시험관내 실험결과 효과가 우수하게 나타난 hTP0 유도체들의 생체내(*in vivo*) 생물학적 활성을 조사하기 위하여, hTP0 유도체들을 마우스에 투여하여 혈소판 수를 측정하였다.

구체적으로, 8주령 정도의 마우스를 평균체중을 기준으로 4-5군으로 나누어 일정한 농도의 hTP0를 피하투여한다. 투여후 3일 정도 경과한 후 말초혈의 채혈을 실시하여 말초혈 중의 혈소판수를 측정한 결과 모든 유도체군들이 천연형 hTP0 보다 혈소판 생성효과가 비슷하거나 저하된 것으로 나타났으나, 유독 40433 유도체만이 천연형 hTP0 보다 효과가 훨씬 우수하게 나타났다(도 6 및 도 7 참조).

상기 실험결과 hTP0의 생체내 활성은 도입된 당쇄수가 많을수록 증가하는 것이 아니라 도입되는 부위와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 즉, hTP0의 활성이 증가하기 위하여는 당쇄가 hTP0의 332개 아미노산 서열 중 특정위치에 도입되어야 함을

알 수 있다.

본 발명에서는 특이적으로 40433 유도체의 생체내 혈소판 생성활성이 천연형 hTPO 보다 유의하게 약 34% 이상 현저히 향상된 결과를 보였으며 투여후 3-4일이 경과된 후부터 약 2일간 천연형 hTPO 보다 활성이 높게 나타나, 이는 임상적으로 혈소판 감소증 치료제 등으로 유용하게 사용될 수 있음이 확인되었다.

본 발명의 40433 유도체가 치료용 약제로 이용되기 위해서는 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제(diluent) 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

구체적으로 물, 인산 완충액, 또는 엑스트로소 용액, 알부민 용액, 항산화제, 데스터린 등과 섞어 투여할 수 있으며, 투여 방법으로는 정맥주사 또는 피하주사를 이용하는 것이 바람직하다.

투여 용량은 천연형보다 상당히 적은 양으로 투여하면 되는데 예를 들면 0.01~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$ 로 투여한다.

본 발명의 40433 유도체는 다양한 질환에 의한 혈소판 감소증 (thrombocytopeina)에 사용될 수 있다.

예를 들면, 항암제 투여, 방사선 요법에 의한 혈소판 감소증, 골수이식에 의한 혈소판 감소증, 간염·간경화에 의한 혈소판 감소증 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 상기 질병을 치료하는 방법으로는 아드리아마이신, 시스플라틴 같은 항암제와 병용투여될 수 있고 IL-3, MCSF, SCF, EPO 등과 같은 혈구촉진 사이토카인

(hematopoietic cytokine)들과 병용 투여될 수 있다.

이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> PCR에 의한 hTPO 유도체를 암호하는 cDNA의 제조

천연형 hTPO 유전자에 부위 특이 돌연변이를 유도하기 위하여, 아미노산을 치환시킬 특이부위를 포함하는 양 방향의 올리고 뉴클레오타이드 6쌍을 제작하고 그 각각을 상기 표 1과 같이 명명하였다.

hTPO 유전자를 증폭시키기 위한 주형으로는 hTPO cDNA가 클로닝되어 있는 공지의 이동벡터 pBlue404(대한민국 특허출원 제 97-7512호)를 사용하였다.

구체적으로 이동벡터 pBlue404 약 50 ng을 주형으로 하고, hTPO 유전자 시그널 서열의 염기 서열을 포함하는 서열 1의 올리고 뉴클레오타이드와 상기 돌연변이 부위를 포함하는 올리고 뉴클레오타이드 쌍 중 서열 1의 올리고 뉴클레오타이드의 반대편 DNA 가닥에 해당하는 올리고 뉴클레오타이드(표 1의 N-시발체)를 시발체로 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 시발체를 μl 당 40 pmol이 되도록 녹인 다음, 그 용액 4 μl 에 *Pfu*(*Pyrococcus furiosus*) 폴리머레이즈(2.5 u/ μl ; Stratagene사, Cat. No. 600153) 1 μl 를 부가하여 최종 100 μl 부피로 하여 PCR 반응을 진행시켰다. PCR은 1차 변성 ; 94°C 90초, 변성 ; 94°C 40초, 시발체 접합 ; 55°C 1분, 효소 신장 반응 ; 72°C 2분 과정을 35회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

마찬가지로 hTPO 유전자의 C-말단 전사해독틀(open reading frame, ORF) 영역과 종결 코돈을 포함하는 염기 서열을 가지는 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드와 앞서 사용한 올리고 뉴클레오타이드의 반대편 DNA 가닥에 해당하는 올리고 뉴클레오타이드(표 1의 C-시발체)를 시발체로 사용하여 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다.

상기와 같은 과정으로 각각 hTPO 유전자의 시그날 서열을 포함하고 N-말단에서 아미노산 치환 부위까지 그리고 아마노산 치환 부위에서 C-말단까지에 해당하는 염기 서열을 가지는 두 유전자 절편을 얻었다.

각 PCR 산물은 1% 아가로오즈 젤 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 큐엑스 II(QIAEX II) 키트(Qiagen사, Cat. No. 20021)를 이용하여 용출하고, 이를 최종적으로 50 μ l가 되도록 삼차증류수에 녹였다.

상기 PCR 산물로부터 돌연변이 서열을 포함하고 시그날 서열을 포함하는 332개의 아미노산을 암호하는 완전한 길이의 hTPO cDNA 유전자를 얻기 위해서, 두 PCR 절편 10 ng씩을 주형으로 하고 서열 1과 서열 2의 올리고 뉴클레오타이드를 시발체로 사용해서 최종 100 μ l 부피로 PCR을 진행시켰다. PCR은 1차 변성 ; 94°C 90초, 변성 ; 94°C 40초, 시발체 접합 ; 58°C 1분, 효소 신장 반응 ; 72°C 2분 과정을 35회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72°C 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다. PCR 산물은 1% 아가로오즈 젤 전기영동을 수행하고 상기와 같은 방법으로 1078 bp 크기의 DNA 밴드를 분리한 다음 30 μ l의 삼차증류수에 녹였다.

상기 과정으로 생성된 hTPO 유도체의 변화된 아미노산 서열과 염기 서열을 상기 표 2에 나타내었다.

<실시예 2> hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물세포 발현 벡터의 제조 및 CHO 세포에서의 발현

실시예 1에서 제조한 hTPO 유도체 유전자를 먼저 공지의 이동벡터인 pBlueBac4(Invitrogen사, Cat. No. V1995-20)에 하기와 같은 방법으로 클로닝하였다.

실시예 1에서 준비한 각 hTPO 유도체의 PCR 산물을 *Bgl*II 와 *Eco*RI 제한효소를 첨가하고 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 1% 아가로오스 젤 전기영동으로 1068 bp의 DNA 절편을 분리하였다. pBlueBac4 벡터는 제한효소 *Bgl*II 및 *Eco*RI으로 상기의 조건에서 절단하여 4771 bp의 DNA 절편을 분리하였다.

hTPO 유도체의 cDNA PCR 산물과 이동벡터 pBlueBac4를 연결시키기 위하여 이들을 4 : 1의 몰비율로 혼합하고 T4 DNA 라이게이즈(NEB사, Cat. No. 202S)를 이용하여 16°C에서 16시간동안 반응시켰다. 이 반응액을 대장균 TOP10F'(Invitrogen사, Cat. No. C3030-03) 균주에 공지의 일렉트로포레이션 방법으로 형질전환시켜 대장균 형질전환체를 획득하였다. 형질전환체 클론을 LB(1 l 당 10g 트립تون, 5g 효모 추출물, 10g NaCl) 배지 50 ml에서 37°C로 18시간 배양한 후, 위자드 미디프렙(Wizard Midiprep) 키트(Promega사, Cat. No. A7640)를 이용하여 그로부터 이동벡터를 대량 추출하였다.

상기와 같은 과정으로 제조된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 이동벡터를 각각 pBlue29, pBlue30, pBlue31, pBlue32, pBlue33, pBlue34 이라고 명명하였다(도 2 참조).

hTPO 유도체 유전자를 포함하는 재조합 동물세포 발현벡터를 제조하기 위해, 천연형 hTPO를 기준의 pCDNA3.1(Invitrogen사, Cat. No. 790-20) 벡터의 *Kpn*I과 *Eco*RI 부위에 삽입하여 제조한 pCDT 벡터를 이용하였다.

구체적으로 pCDT 벡터 DNA 5 μ g을 제한효소 *Eco*RI과 *Nhe*I으로 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 1% 아가로오스 겔 전기영동을 수행하여 4958 bp의 DNA 절편을 분리하였다. 상기에서 제조한 각 hTPO 유도체를 포함하는 이동벡터 5 μ g을 취하여 제한효소 *Eco*RI 및 *Nhe*I으로 상기의 조건하에서 절단하고 1087 bp의 DNA 절편을 분리하였다.

상기 pCDT 벡터와 hTPO 유도체 cDNA 절편을 연결시키기 위하여 각각을 1 : 3의 몰비율로 혼합하고, T4 DNA 라이제이즈를 사용하여 16°C에서 18시간동안 반응시켰다. 이 반응액을 대장균 TOP10F'(Invitrogen사, Cat. No. C3030-03) 균주에 공지의 일렉트로포레이션 방법으로 형질전환시켜 대장균 형질전환체를 획득하였다(도 3 참조). 형질전환체 클론을 LB배지 50 ml에서 37°C로 18시간 배양한 후 위자드 미디프렙(Wizard Midiprep) 키트(Promega사, Cat. No. A7640)를 이용하여 발현벡터를 대량 추출하였다. 상기와 같은 과정으로 제조된 hTPO 유도체 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터를 각각 p40429, p40430, p40431, p40432, p40433, p40434라고 명명하였다(도 3 참조). 분리한 플라스미드 DNA는 제한 효소 *Nhe*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Bsu*36 I으로 절단하여 유전자가 바르게 삽입되었는지를 확인하였으며, 상기 벡터 내 변이된 DNA 부위는 제한효소 지도작성 및 염기 서열 분석을 통하여 확인하였다. DNA 전기 영동법(Maniatis, Molecular cloning, A laboratory manual, 3rd Ed.,

Cold spring harber laboratory (1987)에 따라 각 발현벡터를 정량하여 CHO/K-1 세포주의 형질전환에 사용하였다.

동물세포의 형질전환 과정은 리포펙타민(Lipofectamin; Gibco-BRL사, Cat. No. 18324012) 방법에 따라 실시하였다. 우선 CHO-S-SFM II 배지(Gibco-BRL사, Cat. No. 12052-098) 600 μ l에 각 플라스미드 DNA 12 μ g을 첨가한 후 리포펙타민 36 μ l가 첨가된 CHO-S-SFM II 배지 600 μ l와 잘 섞어 30분간 실온에 방치하였다. 방치후 24시간 전에 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 접종된 CHO/K-1 세포를 CHO-S-SFM II 배지로 1회 세척 후 0.8 ml의 신선한 배지를 가하였다. 30분 경과 후 리포펙타민 및 DNA와 배지 혼합물을 200 μ l씩 6-웰 플레이트에 분주한 후 5시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. 이후 10% FBS가 포함된 배양 배지 1 ml을 첨가한 후 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하고 10% FBS(Gibco-BRL사, Cat. No. 16000-036)가 첨가된 Ham F-12(Gibco-BRL사, Cat. No. 11059) 배지로 교체한 다음, 5% CO₂, 37°C 배양 조건으로 72시간 배양하여 일시적(transient) 발현액을 제조하였다.

그리고 10% FBS가 첨가된 Ham F-12 배지로 교체한 후 48시간이 경과한 후에 6-웰 플레이트 중 한 웰의 세포를 100 mm 디쉬로 옮겨 500 μ g/ml의 제오신(zeocin; Gibco-BRL사, Cat. No. R25001)이 포함된 배지하에서 7-10일 동안 배양하였다. 현미경으로 제오신 내성을 나타내는 콜로니가 형성된 것을 확인한 후, 클로닝 실린더(cloning cylinder; Bellco사, Cat. No. 2090-01010)를 이용하여 각 유도체당 12개 이상의 콜로니를 분리하였다. hTP0의 ELISA 키트(R&D사, Cat. No. DTP00)를 이용하여 발현량을 비교하여 가장 높은 발현량을 나타내는 것을 각 유도체의 발현균주

로 선정하였다.

<실시예 3> 두 부위의 아미노산이 치환된 hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물 세포 발현벡터의 제조 및 CHO 세포에서의 발현

hTPO cDNA 유전자 내에 두 부위의 아미노산을 치환시킨 hTPO 유도체를 제조하기 위하여, 상기 실시예 2에서 제조한 hTPO 유도체 cDNA를 함유한 포유동물세포 발현벡터들을 이용하였다.

구체적으로 p40435의 경우, 발현벡터 p40429를 제한효소 *NheI*과 *BspMI*으로 절단하여 $^{117}\text{Arg} \rightarrow ^{117}\text{Asn}$ 의 아미노산 치환 부위가 포함된 494 bp의 유전자 조각을 분리하였다. 그리고 발현벡터 p40431를 제한효소 *BspMI*과 *Bsu36I*으로 절단하여 $^{147}\text{Gly} \rightarrow ^{147}\text{Asn}$ 의 아미노산 치환 부위가 포함된 355 bp의 유전자 조각을 분리하였다. 또한 hTPO cDNA 유전자가 클로닝되어있는 동물세포 발현벡터 pCDT를 제한효소 *NheI*과 *Bsu36I*으로 절단한 후, 상기의 두 유전자 조각과 연결하여 $^{117}\text{Arg} \rightarrow ^{117}\text{Asn}$ 과 $^{147}\text{Gly} \rightarrow ^{147}\text{Asn}$ 의 두 부위의 아미노산을 치환된 hTPO 유도체 cDNA를 함유하는 동물 세포 발현벡터 p40435를 제조하였다.

$^{117}\text{Arg} \rightarrow ^{117}\text{Asn}$ 과 $^{164}\text{Arg} \rightarrow ^{164}\text{Asn}$ 의 아미노산 치환을 포함하는 p40436은 앞서 p40429로부터 분리한 494 bp의 유전자 조각과 발현벡터 p40433를 제한효소 *BspMI*과 *EcoRI*으로 절단하여 분리한 $^{164}\text{Arg} \rightarrow ^{164}\text{Asn}$ 을 포함하는 593 bp의 유전자 조각을 제한효소 *NheI*과 *EcoRI*으로 절단하여 분리한 동물 세포 발현벡터 pCDT와 연결하여 제조하였다.

p40437, p40438, p40439의 경우도 상기와 마찬가지로 각각에 해당하는 2종의 발현

벡터로부터 치환된 아미노산 부위를 포함하는 유전자 조각을 분리하여 동물 세포 발현벡터 pCDT에 클로닝하는 방법으로 제조되었다(표 3).

제조된 5종의 동물세포 발현벡터를 실시예 2에서와 같이 6-웰 플레이트에서 CHO/K-1 세포에 형질전환시켜 일시적 발현액을 얻었다. 그리고 실시예 2에서와 같이 제오신 내성을 가지는 발현 균주를 분리하였다.

<실시예 4> hTPO 유도체의 M-07e 세포증식 검정법에 의한 생물학적 활성 평가

거핵세포성 백혈병 세포주(Megakaryocyte leukemia cell line) M-07e는 GM-CSF(100 u/ml), 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배양배지(Gibco-BRL사, Cat. No. 22400-089)로 유지하였다.

활성평가를 하기 위해서, 평가 배지(5% FBS, RPMI1640)를 제조한 다음 상기에서 배양된 세포를 원심분리하여 모으고 RPMI1640으로 3회 씻어낸 후, 최종 평가 배지로 8×10^4 세포/ml이 되도록 조정하여 T-75 플라스크에 부유시키고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 다시 세포를 모아서 1×10^5 세포/ml이 되도록 조정하여 96-웰 플레이트에 100 μl씩 분주하였다. 표준물질(rhTPO, 25 μg)을 RPMI1640으로 8가지 농도(100.0~0.78125 ng/ml)로 연속 희석하여 준비하였다. 대조물질은 CHO 세포 유래 천연형 hTPO를 사용하였고, 총 11종 유도체를 각 1.5625, 6.25, 25 ng/ml의 농도로 희석하여 준비한 후에 각 시료를 웰당 100 μl씩 분주하여 최종부피를 200 μl로 맞추고 5% CO₂ 배양기에 넣어 20시간동안 배양한 후에 1 μCi(37 kBq) ³H-티미딘을 첨가하고, 4시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 4시간이 경과한 후 배양 기에서 실험용 플레이트를 꺼내어 유리섬유 필터가 장착된 세포수집기로 세포만을

수집하고 PBS를 사용하여 7회 씻어주었다.

세포가 수집된 필터를 측정 바이알에 순서대로 넣고 액체 섬광 계수기(Liquid scintillation counter)로 ^3H -방사능(^3H -radioactivity)을 측정하고, 리아스마트(Riasmart) 소프트웨어를 사용하여 표준물질, 대조물질과 시료의 최고농도의 증가치(Half-maximal) 농도를 계산하여 각 농도에서의 활성을 비교 측정하였다.

각 농도에서의 활성은 유도체간에 거의 같은 양상을 나타내었으며, 천연형 hTPO와 비교하여 동등이상의 활성을 나타낸 것은 25 ng/ml의 농도에서 40429, 40430, 40432, 40433, 40434, 40437, 40438, 40439의 8종이었다. 각각의 생물학적 활성은 천연형 hTPO의 역가를 100으로 보았을 때 117, 135, 120, 131, 97, 121, 166, 133%의 증감을 나타내었다(도 4 참조).

<실시예 5> 천연형 hTPO의 생체내(*in vivo*) 활성

동물세포에서 유래한 천연형 hTPO를 처치한 마우스로부터 혈소판수를 측정하여 도 5에 나타내었다. 동물은 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 7주령으로 구입하여 (Charles River사, 일본) 항온($24 \pm 1^\circ\text{C}$), 항습(55%), 조명시간 12시간(오전 7시-오후 7시)에 설정된 대웅제약 중앙연구소 동물실에서 1주간 정도 사육 순화후 사용하였다. 시험기간 중에도 동물은 동일 사육실에서 사육하였다.

1군에 5마리가 되도록 체중을 지표로 한 충별 무작위 추출에 의해 마우스를 군분리하고, 각각 배양배지 투여군, 천연형 트롬보포에틴 투여군 및 약제를 투여하지 않는 무처치군으로 설정하였다. 천연형 hTPO는 각각 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 단회 투여하였으며, 채혈은 투여 시작일을 1일째로 하여 4일차, 8일

차, 10일차에 시행하고 채혈 전일의 투여로부터 24시간 이내에 행하였다. 에테르 마취하에 마우스의 복부하대정맥으로부터 전혈을 채취하고 EDTA 처리 튜브에 옮긴 다음 말초혈중의 혈소판 수를 자동 혈구계측기(Cell dyn 3500, 애보트사)를 사용하여 측정하였다. 결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 천연형 hTPO는 혈소판수의 증가를 자극하였으며 4일차에 증가하기 시작하여 8일차에 최대 혈소판수를 나타내었고, 10일차에는 약 20% 감소하였다.

<실시예 6> CHO 세포에서 발현된 hTPO 유도체의 생체내 활성

우선, hTPO 유도체 시료를 제조하기 위하여, 각 유도체의 발현균주를 셀 팩토리 (cell factory; Nunc사, Cat. No. 170009)를 사용하여 10 ℓ 대량배양하였다. 10% FBS가 첨가된 Ham F-12 배지로 각 발현균주 세포를 5×10^4 세포/ml로 셀 팩토리에 계대한 후 72시간 경과후 PBS로 1회 씻어주고 엑셀 배지(ExCell; JRH사, Cat. No. 14311-10L)로 교체하였다. 5% CO₂, 37°C에서 96시간 동안 배양한 후 배양 상등액을 얻은 다음, 펠리콘(pelicon) 농축기(Millipore사, Cat. No. 42PEL60)를 사용하여 1차 농축을 수행하고 미니탄(minitan) 농축기(Millipore사, Cat. No. 80EL004)를 사용하여 2차 농축을 수행하였다. 농축된 각 시료는 1×TNT 완충용액(10 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween20, pH 7.4)으로 4°C에서 30시간 동안 투석을 실시하고 마지막으로 올트라프리(Ultrafree; Millipore사, Cat. No. UFV2BGC10)로 3차 농축을 수행하였다. 얻어진 시료를 ELISA 키트로 3회 정량하여 생체내 시험에 사용하였다.

생체내 활성시험은 동물세포에서 발현된 hTPO 유도체를 투여한 마우스로부터의 혈

소판수를 측정하는 방법으로 수행되었으며, 도 6 및 도 7에 나타내었다. 동물은 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 7주령으로 구입하여(Charles River사, 일본) 항온($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 항습(55%), 조명시간 12시간(오전 7시-오후 7시)에 설정된 대웅제약 중앙연구소 동물실에서 1주간 정도 사육 순화후 사용하였다. 시험기간 중에도 동물은 동일 사육실에서 사육하였다.

1군에 5마리가 되도록 체중을 지표로 한 충별 무작위 추출에 의해 마우스를 군분리하고, 각각 배양배지 투여군, 천연형 트롬보포에틴 투여군, 각 유도체 투여군 및 약제를 투여하지 않는 무처치군으로 설정하였다.

hTPO 유도체는 $36 \mu\text{g}/\text{kg}$ 와 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 의 일정한 농도로 단회 피하투여 하였고, 채혈은 투여시작일을 0일째로 하여 10일차까지 매일 시행하였으며, 채혈 전일의 투여로부터 24시간 이내에 행하였다. 에테르 마취하에 마우스의 복부하대정맥으로부터 전혈을 채취하고 EDTA 처리튜브에 옮긴 다음 말초혈중의 혈소판 수를 자동 혈구계 측기(Cell dyn 3500, 에보트사)를 사용하여 측정하였다. 결과는 평균±표준오차로 나타내었다.

천연형 hTPO는 혈소판수의 증가를 자극하여 3일차부터 증가하기 시작하여 5일차에 최대 혈소판수를 나타내었으며, 10일차에는 정상수준으로 회복되었다. 처치한 모든 유도체는 혈소판수의 증가를 자극하였으나, 40433 유도체를 제외한 다른 유도체들은 모두 천연형 hTPO에 비해 증강된 활성을 나타내지 못했다. 반면 40433 유도체는 생체내 혈소판 생성활성이 천연형 hTPO보다 유의하게 약 34% 이상 현저히 향상된 결과를 보였다.

【발명의 효과】

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 hTPO 유도체는 생체내에서 혈소판 전구세포의 증식을 유도하고 혈소판 증식의 약효가 매우 향상된 hTPO 유도체로서 항암치료나 골수이식에 따른 혈소판 감소증의 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 특히 천연형 hTPO의 164번 아미노산인 아르기닌을 아스라파진으로 치환시킨 40433은 천연형 보다 혈소판 생성 효능이 유의적으로 매우 향상된 결과를 보이는 것으로 다음과 같은 잇점을 제공한다. 즉, 투여 용량을 낮추어서 투여한 경우에도 천연형과 유사한 효능을 보임으로 혈소판 감소증 환자들에게 투여용량 및 투여횟수를 감소시켜 환자 치료비용을 경감시키고 환자의 복지를 향상시켜 주며 적은 양의 투여로 인한 불순 단백질의 유입이 극소화됨으로써 물질의 안전성을 증대시킬 수 있다.

【서열목록】

서열번호 : 1

서열의 길이 : 23

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

【서열 1】

5'-GAAGATCTAT GGAGCTGACT GAA-3'

[서열목록]

서열번호 : 2

서열의 길이 : 24

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

【서열 2】

5'-ATGAATTCTC ACCCTTCCTG AGAC-3'

[서열목록]

서열번호 : 3

서열의 길이 : 25

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

【서열 3】

5'-GGACTAGAGA CGTGTGCTG GGGAC-3'

[서열목록]

서열번호 : 4

서열의 길이 : 25

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오파이드)

【서열 4】

5'-GTCCCCAGCA ACACGTCTCT AGTCC-3'

[서열목록]

서열번호 : 5

서열의 길이 : 332

서열의 형 : 아미노산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

【서열 5a】

S P A P P A C D L R V L S K L L 16
R D S H V L H S R L S Q C P E V 32
H P L P T P V L L P A V D F S L 48
G E W K T Q M E E T K A Q D I L 64
G A V T L L L E G V M A A R G Q 80
L G P T C L S S L L G Q L S G Q 96
V R L L L G A L Q S L L G T Q L 112
P P Q G R T T A H K D P N A I F 128
L S F Q H L L R G K V R F L M L 144
V G G S T L C V R R A P P T T A 160
V P S N T S L V L T L N E L P N 176
R T S G L L E T N F T A S A R T 192

【서열 5b】

T G S G L L K W Q Q G F R A K I 208
P G L L N Q T S R S L D Q I P G 224
Y L N R I H E L L N G T R G L F 240
P G P S R R T L G A P D I S S G 256
T S D T G S L P P N L Q P G Y S 272
P S P T H P P T G Q Y T L F P L 288
P P T L P L P V V Q L H P L L P 304
D P S A P T P T P T S P L L N T 320
S Y T H S Q N L S Q E G 332

[서열목록]

서열번호 : 6

서열의 길이 : 996

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 유전자

【서열 6a】

AGCCCGGCTC CTCCCTGCTTG TGACCTCCGA GTCCTCAGTA AACTGCTTCG TGACTCCCAT	60
GTCCTTCACA GCAGACTGAG CCAGTGCCCA GAGGTTCACCC CTTTGCCTAC ACCTGTCCCTG	120
CTGCCTGCTG TGGACTTTAG CTTGGGAGAA TGGAAAACCC AGATGGAGGA GACCAAGGCA	180
CAGGACATTC TGGGAGCAGT GACCCTCTG CTGGAGGGAG TGATGGCAGC ACGGGGACAA	240
CTGGGACCCA CTTGCCTCTC ATCCCTCCTG GGGCAGCTTT CTGGACAGGT CCGTCTCCTC	300
CTTGGGGCCC TGCAGAGCCT CCTTGGAACCC CAGCTTCCTC CACAGGGCAG GACCACAGCT	360
CACAAGGATC CCAATGCCAT CTTCCCTGAGC TTCCAACACC TGCTCCGAGG AAAGGTGCGT	420
TTCCTGATGC TTGTAGGAGG GTCCACCCCTC TGCGTCAGGC GGGCCCCACC CACCACAGCT	480
GTCCCCAGCA ACACGTCTCT AGTCCTCACA CTGAACCGAGC TCCCACACAG GACTTCTGGA	540
TTGTTGGAGA CAAACTTCAC TGCCTCAGCC AGAACTACTG GCTCTGGCT TCTGAAGTGG	600
CAGCAGGGAT TCAGAGCCAA GATTCCCTGGT CTGCTGAACC AAACCTCCAG GTCCCTGGAC	660
CAAATCCCCG GATACTGAA CAGGATACAC GAACTCTTGA ATGGAACCTCG TGGACTCTT	720

【서열 6b】

CCTGGACCCCT CACGCAGGAC CCTAGGAGCC CGGGACATTT CCTCAGGAAC ATCAGACACA	780
GGCTCCCTGC CACCCAACCT CCAGCCTGGA TATTCTCCTT CCCCAACCCA TCCTCCTACT	840
GGACAGTATA CGCTCTTCCC TCTTCCACCC ACCTTGCCCA CCCCTGTGGT CCAGCTCCAC	900
CCCCCTGCTTC CTGACCCCTTC TGCTCCAACG CCCACCCCTA CCAGCCCTCT TCTAACACAA	960
TCCTACACCC ACTCCCCAGAA TCTGTCTCAG GAAGGG	996

【특허청구범위】

【청구항 1】

164번 아미노산이 아스파라진인 것을 특징으로 하는 인간 트롬보포이에틴 유도체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 서열 5로 표시되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 인간 트롬보포이에틴 유도체.

【청구항 3】

제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체를 암호하는 재조합 인간 트롬보포이에틴 유전자.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 서열 6으로 표시되는 염기 서열인 것을 특징으로 하는 재조합 인간 트롬보포이에틴 유전자.

【청구항 5】

제 1항에 기재된 아미노산 서열로 구성된 단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현벡터 p40433.

【청구항 6】

제 5항의 발현벡터 p40433 으로 형질전환된 포유동물 세포주 CHO K-1/p40433 (KCTC 0495BP).

【청구항 7】

제 3항의 재조합 DNA로 형질전환된 포유동물 세포주를 배양하여 인간 트롬보포이에

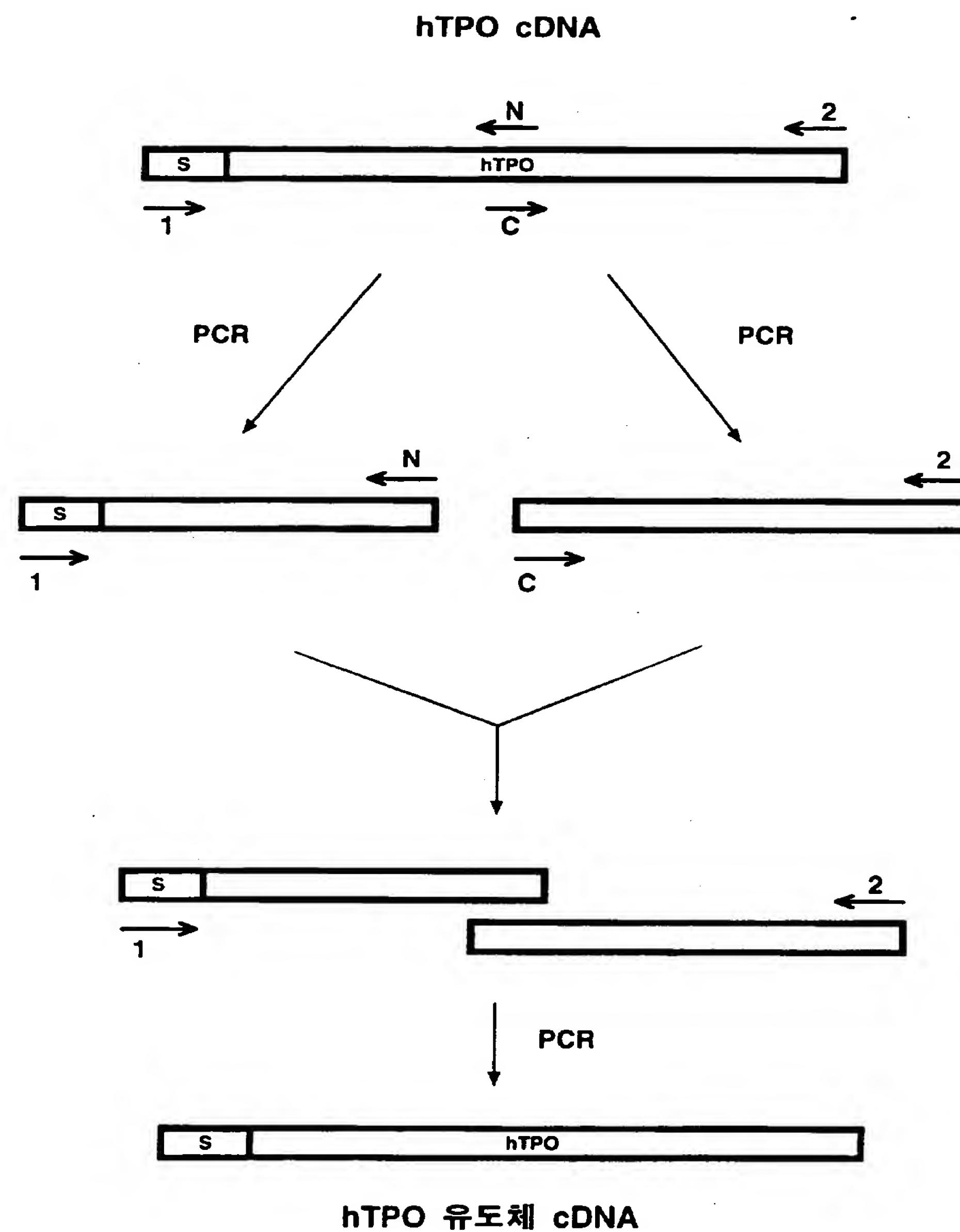
틴 유도체를 얻는 것을 특징으로 하는 제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체의 제조방법.

【청구항 8】

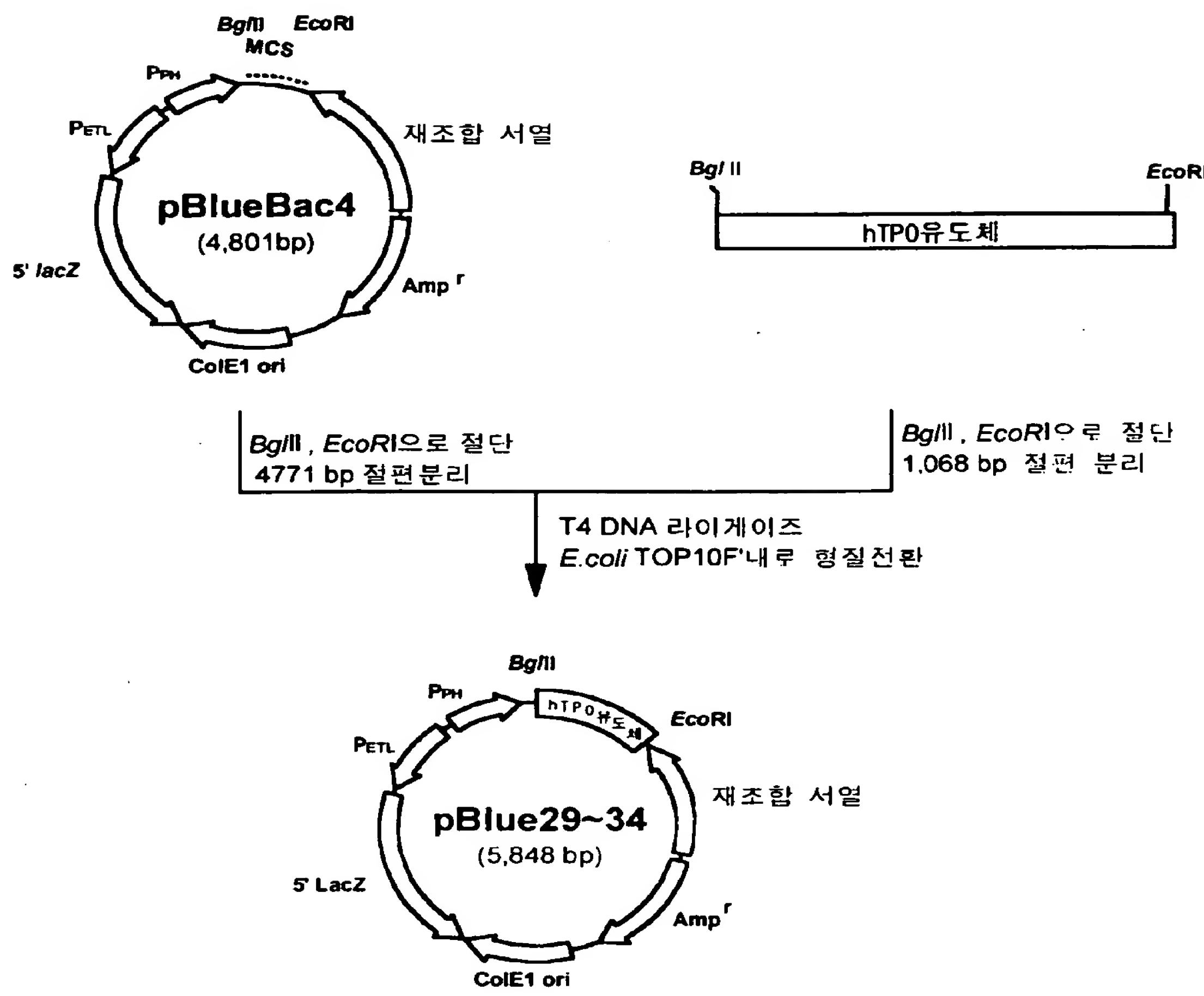
제 1항의 인간 트롬보포이에틴 유도체를 유효성분으로 하는 혈소판 감소증 치료제 용 약학적 조성물.

【도면】

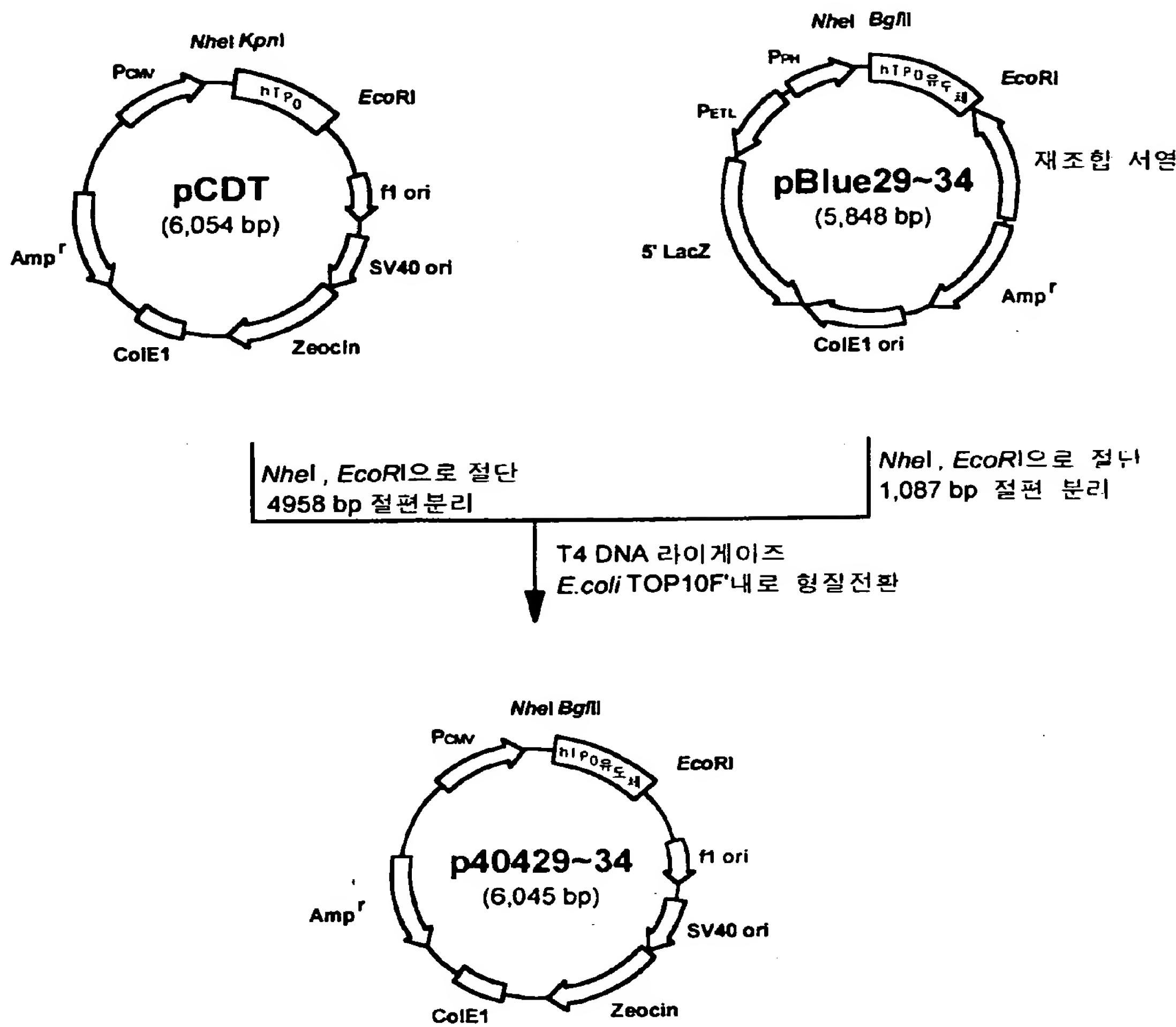
【도 1】



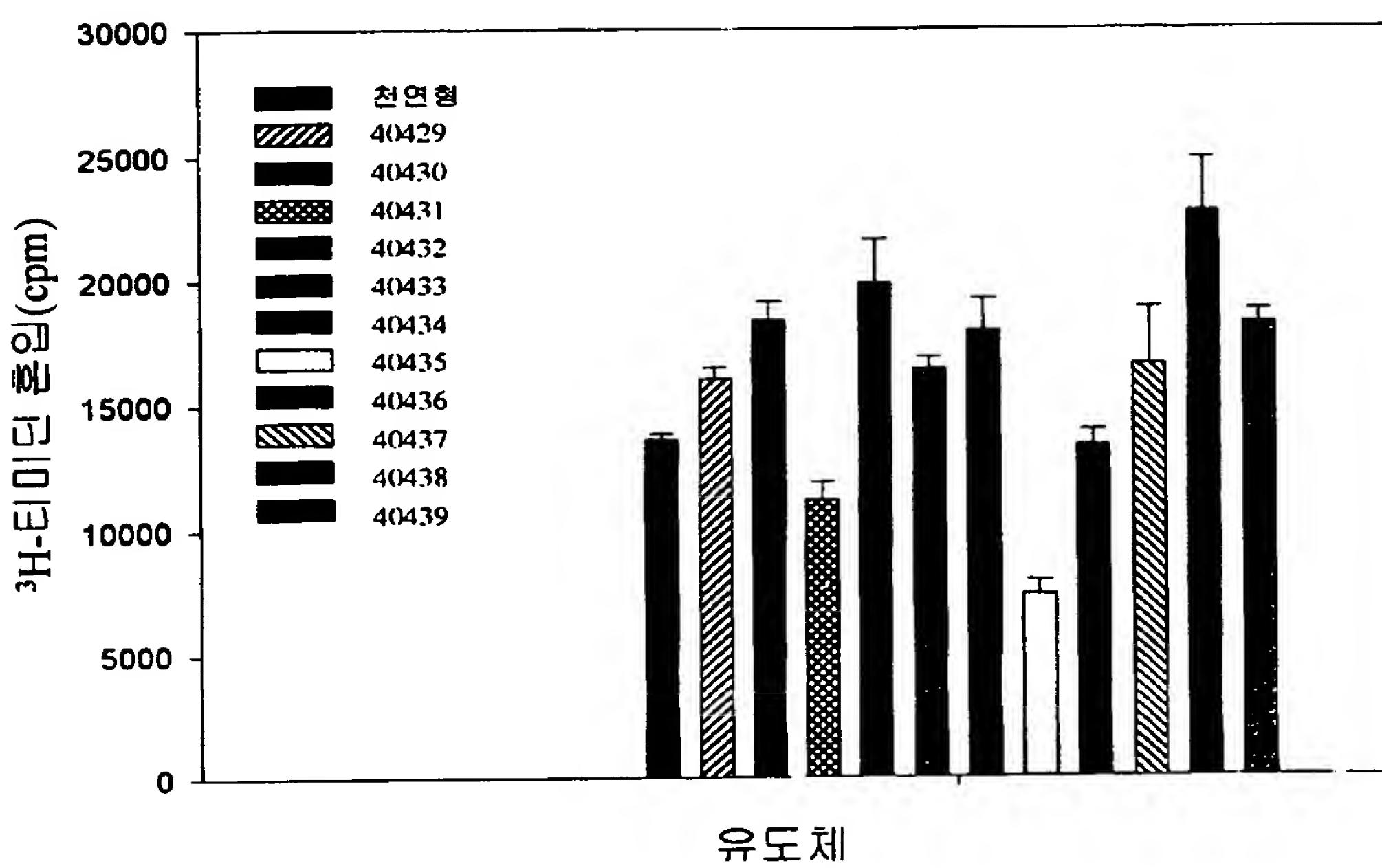
【도 2】



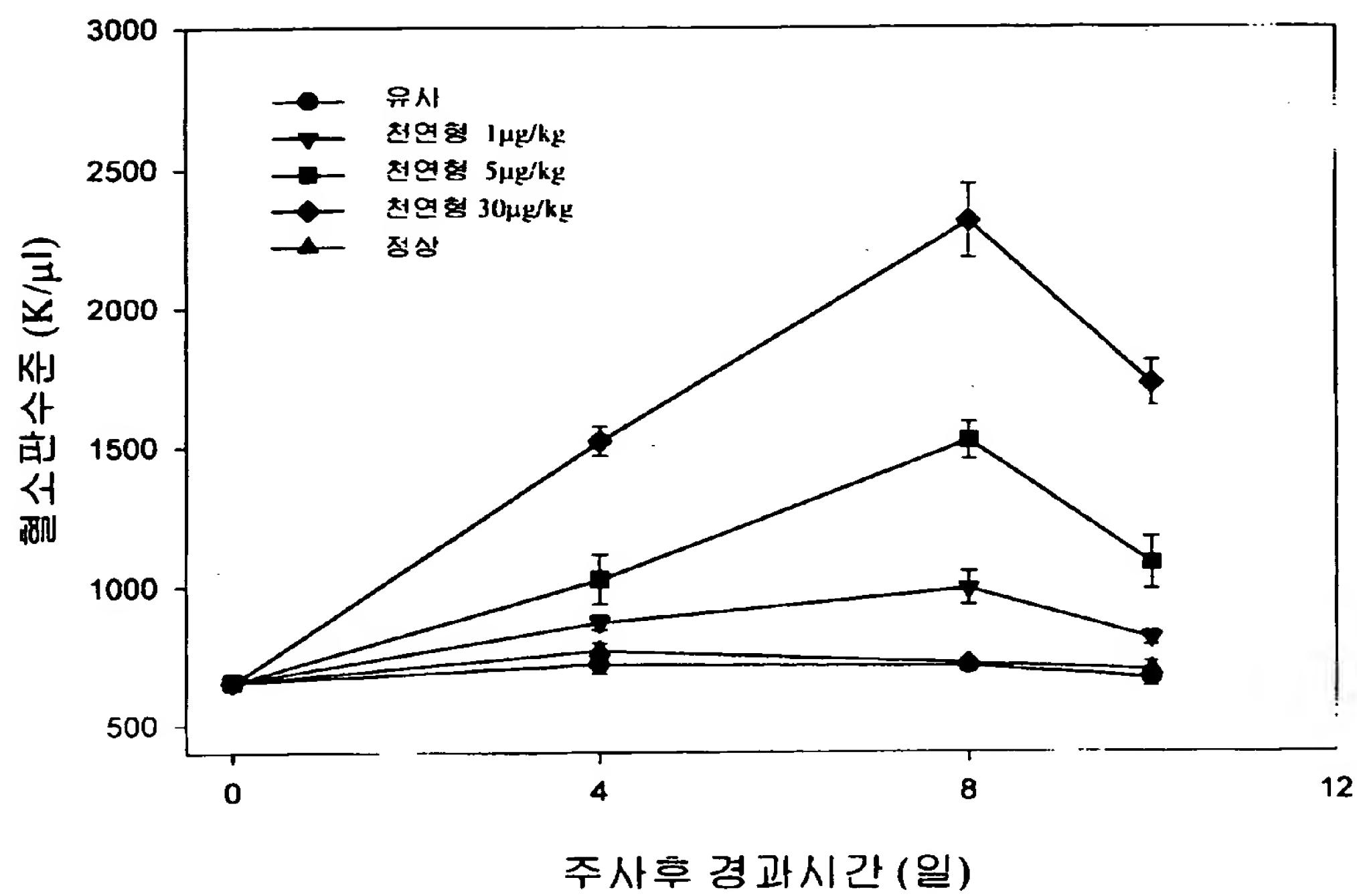
【도 3】



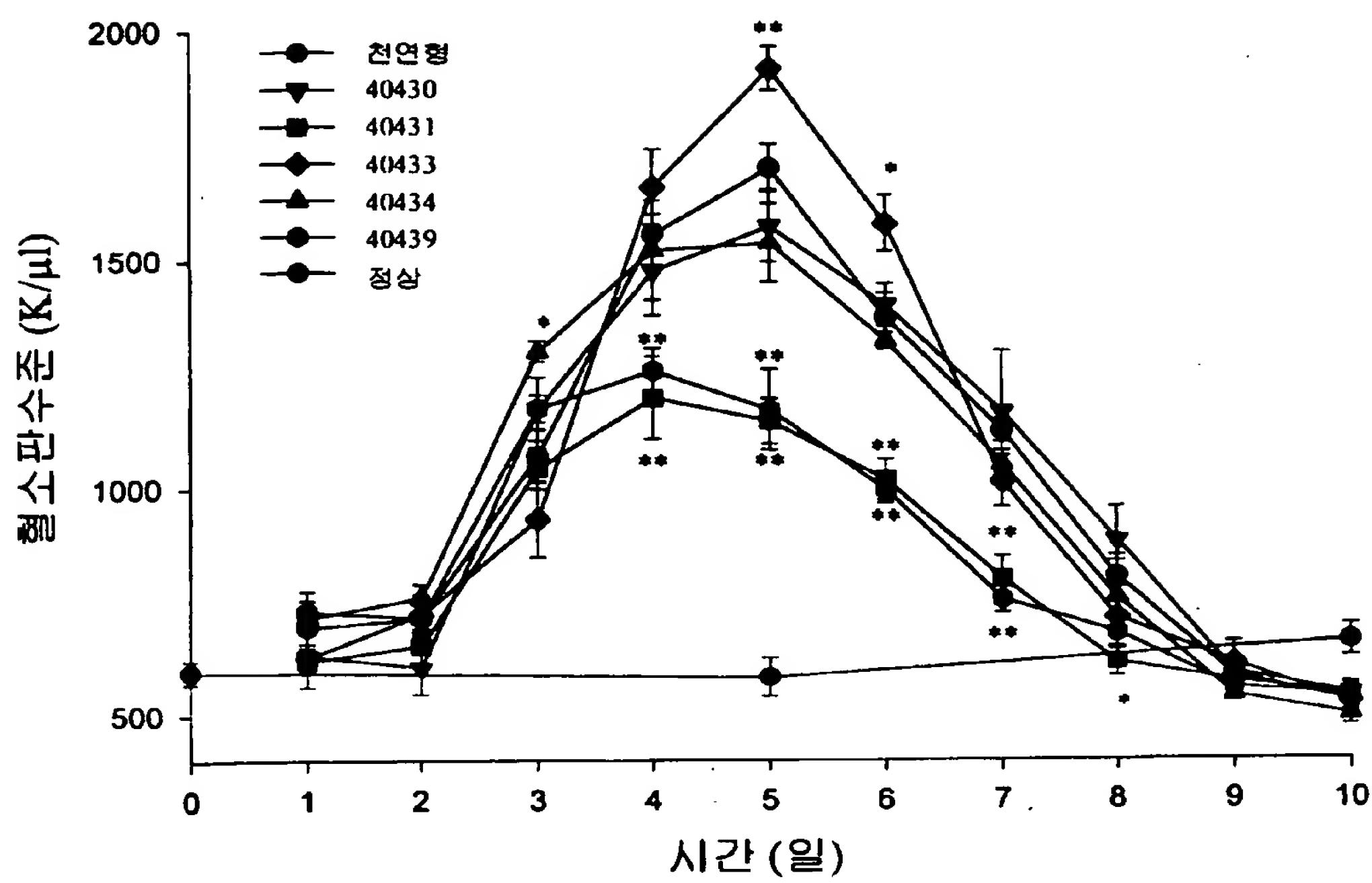
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

